

イプフルフェノキン分析法（畜産物）

1. 分析対象化合物

- ・イプフルフェノキン

2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

3. 試薬、試液

イプフルフェノキン	:	分析用標準品
アセトニトリル、アセ トン、 ヘキサン	:	特級
酢酸	:	精密分析用
アセトニトリル	:	HPLC用
水	:	水道水をMilli-Q System（Millipore製）で精製 したもの
HLBミニカラム	:	OASIS PRiME HLB 500mg/6mL （Waters製）

4. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 筋肉、肝臓及び腎臓の場合

均一化した試料5 gにアセトニトリル及び水（1：1）混液50 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、毎分8500回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトニトリル及び水（1：1）混液40 mLを加え、10分間振とうした後、遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトニトリル及び水（1：1）混液40 mLを加え、10分間振とうした後、遠心分離し、上澄液を採る。さらに、残留物にアセトニトリル50 mLを加え、10分間振とうした後、遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に200 mLとする。

② 脂肪の場合

均一化した試料5 gにヘキサン及びアセトン（4：1）混液80 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、毎分8500回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にヘキサン及びアセトン（4：1）混液50 mLを加え、10分間振とうした後、遠心分離し、上澄液を採る。さらに、残留物にアセトン50 mLを加え、10分間振とうした後、遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に200 mLとする。

③ 乳の場合

均一化した試料5 gにアセトニトリル及び水（1：1）混液80 mLを加え、10分間超音波抽出した後、毎分8500回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトニトリル及び水（1：1）混液50 mLを加え、10分間超音波抽出した後、遠心分離し、上澄液を採る。さらに、残留物にアセトニトリル50 mLを加え、10分間超音波抽出した後、遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、アセトニトリルを加えて正確に200 mLとする。

④ 卵白の場合

均一化した試料5 gにアセトニトリル及び水（7：3）混液50 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、毎分8500回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトニトリル及び水（7：3）混液40 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、遠心分離し、上澄液を採る。残留物にアセトニトリル及び水（7：3）混液40 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、遠心分離し、上澄液を採る。さらに、残留物にアセトニトリル40 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、水を加えて正確に200 mLとする。

⑤ 卵黄の場合（脂肪の場合と同じ）

均一化した試料5 gにヘキサン及びアセトン（4：1）混液80 mLを加え、3分間ホモジナイズした後、毎分8500回転で5分間遠心分離し、上澄液を採る。残留物にヘキサン及びアセトン（4：1）混液50 mLを加え、10分間振とうした後、遠心分離し、上澄液を採る。さらに、残留物にアセトン50 mLを加え、10分間振とうした後、遠心分離し、上澄液を採る。得られた上澄液を合わせ、アセトンを加えて正確に200 mLとする。

2) 精製

HLBミニカラムによる精製

① 脂肪及び卵黄以外の場合

HLBミニカラムにアセトニトリル5 mL、アセトニトリル及び水（7：3）混液5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた抽出液4 mLを注入する。その後、アセトニトリル及び水（7：3）混液5 mLを注入し、全ての溶出液を目盛付容器に捕集し、アセトニトリル及び水混液（7：3）で10 mLに定容し、試験溶液とする。

② 脂肪及び卵黄の場合

1) で得られた抽出液4 mLを40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル3.5 mL及び水1.5 mLを加えて溶かす。HLBミニカラムにアセトニトリル5 mL、アセトニトリル及び水（7：3）混液5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに先の溶液を注入する。その後、アセトニトリル

ル及び水（7：3）混液4 mLを注入し、全ての溶出液を目盛付容器に捕集し、アセトニトリル及び水混液（7：3）で10 mLに定容し、試験溶液とする。

5. 検量線の作成

イプフルフェノキン標準品をアセトニトリルに溶解し、100 µg/mLの標準原液を調製する。調製した標準原液をアセトニトリルで希釈して検量線用の標準液を数点調製し、それぞれLC-MS/MSに注入し、ピーク面積法で検量線を作成する。

6. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、5. の検量線を用いて含量を定量する。

7. 測定条件

装置	: LC 30-AD シリーズ（島津製作所製）／TRIPLE QUAD 5500（AB Sciex 製）																								
カラム	: ACQUITY UPLC BEH Shield RP18（Waters製）1.7µm（2.1mm i.d.×100mm）																								
カラム温度	: 40 °C																								
移動相	: 移動相A：0.1%酢酸 移動相B：0.1%酢酸アセトニトリル溶液																								
グラジエント	: <table border="1" data-bbox="566 1216 1347 1346"> <tr> <td>時間（分）</td> <td>0.0</td> <td>2.0</td> <td>6.0</td> <td>6.1</td> <td>8.0</td> <td>8.1</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>移動相A（%）</td> <td>90</td> <td>50</td> <td>25</td> <td>5</td> <td>5</td> <td>90</td> <td>90</td> </tr> <tr> <td>移動相B（%）</td> <td>10</td> <td>50</td> <td>75</td> <td>95</td> <td>95</td> <td>10</td> <td>10</td> </tr> </table>	時間（分）	0.0	2.0	6.0	6.1	8.0	8.1	10	移動相A（%）	90	50	25	5	5	90	90	移動相B（%）	10	50	75	95	95	10	10
時間（分）	0.0	2.0	6.0	6.1	8.0	8.1	10																		
移動相A（%）	90	50	25	5	5	90	90																		
移動相B（%）	10	50	75	95	95	10	10																		
流量	: 0.3 mL/min																								
注入量	: 5 µL																								
保持時間の目安	: イプフルフェノキン；5.2分																								
イオン化モード	: ESI（+）																								
モニタリングイオン	: <table border="1" data-bbox="566 1556 1347 1762"> <tr> <td></td> <td>プレカーサーイオン (<i>m/z</i>)</td> <td>プロダクトイオン (<i>m/z</i>)</td> </tr> <tr> <td>イプフルフェノキン</td> <td>348.1</td> <td>330.1</td> </tr> </table>		プレカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)	イプフルフェノキン	348.1	330.1																		
	プレカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)																							
イプフルフェノキン	348.1	330.1																							

8. 定量限界

0.01 mg/kg

9. 添加回収試験を実施した食品

牛乳、牛の筋肉、肝臓、腎臓、脂肪、鶏卵、鶏の筋肉、肝臓、皮、脂肪

10. 留意事項

顕著なマトリックス効果が観察された場合はマトリックス検量線を採用する。

※ 本分析法は、農作物及び畜産物における残留試験等において用いられた残留農薬等分析法であり、新たな試験法の開発等に際して参考として下さい。なお、当該分析法をもとに開発した試験法を食品規格への適合判定のために使用する場合には、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（平成 22 年 12 月 24 日薬食発 1224 第 1号）」に従って使用する試験法の妥当性を評価する必要があります。